

COPYRIGHT: 1991, JPO & Japio

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

03005495

January 11, 1991

MODIFIED PHOSPHORAMIDITE PROCESS FOR PRODUCING MODIFIEDNUCLEIC ACID

INVENTOR: SELIGER HEINZ-HARTMUT; BERNER SIBYLLE; MUEHLECKER KLAUS; VON DER ELTZ HERBERT; BATZ HANS-GEORG

APPL-NO: 02132429

FILED-DATE: May 22, 1990

PRIORITY: May 24, 1989 - 89 3916871, Germany (DE)

ASSIGNEE-AT-ISSUE: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH

PUB-TYPE: January 11, 1991 - Un-examined patent application (A)

PUB-COUNTRY: Japan (JP)

IPC-MAIN-CL: C 07H021#4

IPC ADDL CL: G 01N033#50

CORE TERMS: nucleotide, formula, detectable, sequence, modified, compd

ENGLISH-ABST:

NEW MATERIAL: A nucleotide sequence represented by formula I [wherein K is H, nucleotide, etc.; J is an OH group, nucleotide, etc.; B is a (modified) nuclear base; T is H, a lower alkyl, azide, etc.; X is O or S; L is a (n+1) valent crosslinking group; U is O, S, N or N-H, n is 1- 200, W is a detectable group or a group changeable to the detectable group].

EXAMPLE: 5'-O-dimethoxytrityl-2'-deoxythymidine-3'-O-[2-(9- fluorenylmethoxycarbonyl)aminoethyl]-N,N-diisopropylamino-phosphone.

USE: A reagent for producing modified nucleic acid.

PROCESS: For example, a nucleotide sequence represented by formula II is reacted with a compd. represented by formula Y-W (wherein Y is a reactive group) (e.g. 2-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)aminoethyl-N, N-diisopropylamino-phosphochloridite) to obtain the compd. represented by the formula I.

## ⑫ 公開特許公報 (A) 平3-5495

⑬ Int. Cl.

C 07 H 21/04  
G 01 N 33/50

識別記号

序内整理番号

Z 7822-4C  
P 7055-2G

⑭ 公開 平成3年(1991)1月11日

審査請求 有 請求項の数 12 (全15頁)

⑮ 発明の名称 修飾された核酸を製造するための修飾されたホスホルアミダイト法

⑯ 特願 平2-132429

⑯ 出願 平2(1990)5月22日

優先権主張 ⑯ 1989年5月24日 ⑯ 西ドイツ(DE) ⑯ P 39 16 871.9

⑰ 発明者 ハインツ-ハルツムート・ゼーリゲル ドイツ連邦共和国7915エルヒンゲン-タルフインゲン、ハーゼンヴェーク1番

⑰ 発明者 シビレ・ペルネル ドイツ連邦共和国8900アウグスブルク、ゲーテストラーゼ62番

⑰ 出願人 ベーリンガー・マンハイム・ゲゼルシャフト・ミット・ベシユレンクテル・ハフツング ドイツ連邦共和国6800マンハイム31、ザントホーフアーストラツセ116番

⑯ 代理人 弁理士 青山 葵 外1名  
最終頁に続く

## 明細書

り、

## 1. 発明の名称

修飾された核酸を製造するための修飾されたホスホルアミダイト法

Xは、酸素原子または硫黄原子であり、

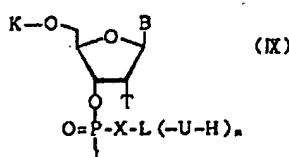
しは、(n+1)価の架橋結合基であり、

## 2. 特許請求の範囲

Uは、酸素原子、硫黄原子、空素原子またはN

## (1) 式(IX):

-Hであり、



nは、1~200の自然数である】

で示されるヌクレオチド配列を、式(IV):



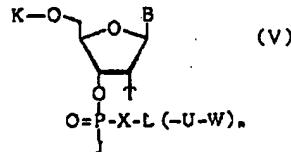
【式中、

Yは、反応性基であり、

Wは、検出可能な基または検出可能な基に変化し得る基である】

で示される化合物と反応させることを特徴とする、

式(V):



【式中、

Kは、水素原子、または別のヌクレオチドもし

Kは、水素原子、または別のヌクレオチドもし  
くはヌクレオチド配列のリン酸エチル残基のリ  
ン原子であり、Jは、ヒドロキシル基、または別のヌクレオチ  
ドもしくはヌクレオチド配列の5'位の酸素原子  
であり、

Bは、天然のまたは修飾された核塩基であり、

Tは、水素原子、低級アルキル基、アジド基、

低級アルキルオキシ基またはヒドロキシル基であ

くはスクレオチド配列のリン酸エステル残基のリン原子であり、

Jは、ヒドロキシル基、または別のスクレオチドもしくはスクレオチド配列の5'位の酸素原子であり、

Bは、天然のまたは修飾された核塩基であり、

Tは、水素原子、低級アルキル基、アジド基、低級アルキルオキシ基またはヒドロキシル基であり、

Xは、酸素原子または硫黄原子であり、

Lは、(n+1)価の架橋結合基であり、

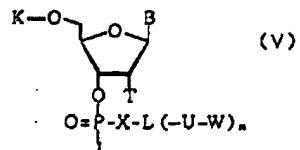
Uは、酸素原子、硫黄原子、窒素原子またはN-Hであり、

Wは、検出可能な基または検出可能な基に変化し得る基であり、

nは、1~200の自然数である】

で示されるスクレオチド配列の製造方法。

(2) 式(V):



【式中、

Kは、水素原子、または別のスクレオチドもしくはスクレオチド配列のリン酸エステル残基のリン原子であり、

Jは、ヒドロキシル基、または別のスクレオチドもしくはスクレオチド配列の5'位の酸素原子であり、

Bは、天然のまたは修飾された核塩基であり、

Tは、水素原子、低級アルキル基、アジド基、低級アルキルオキシ基またはヒドロキシル基であり、

Xは、酸素原子または硫黄原子であり、

Lは、(n+1)価の架橋結合基であり、

Uは、酸素原子、硫黄原子、窒素原子またはN-Hであり、

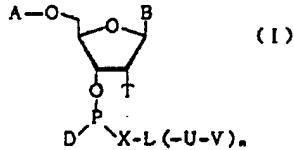
Wは、検出可能な基または検出可能な基に変化

し得る基であり、

nは、1~200の自然数である】

で示されるスクレオチド配列。

(3) 式(I):



【式中、

Aは、酸素原子保護基、スクレオチドまたはオリゴスクレオチドであり、

Bは、天然のまたは修飾された核塩基であり、

Xは、酸素原子または硫黄原子であり、

Lは、(n+1)価の架橋結合基であり、

Tは、水素原子、低級アルキル基、アジド基、低級アルキルオキシ基または所望により保護されたヒドロキシル基であり、

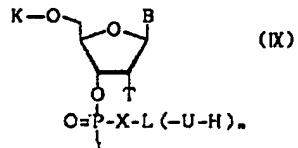
Uは、酸素原子、硫黄原子、窒素原子またはN-Hであり、

Vは、開裂し得る保護基であり、

nは、1~200の自然数であり、

Dは、第2アミン残基である】

で示される化合物を、遊離5'-ヒドロキシル基を有する別のスクレオチドと反応させ、ついで生成したスクレオチド配列を酸化することを特徴とする式(IX):



【式中、

Kは、水素原子、または別のスクレオチドもしくはスクレオチド配列のリン酸エステル残基のリン原子であり、

Jは、ヒドロキシル基、または別のスクレオチドもしくはスクレオチド配列の5'位の酸素原子であり、

Bは、天然のまたは修飾された核塩基であり、

Tは、水素原子、低級アルキル基、アジド基、

低級アルキルオキシ基またはヒドロキシル基であ

り、

Xは、酸素原子または硫黄原子であり、

Lは、(n+1)価の架橋結合基であり、

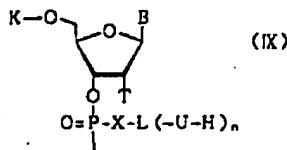
Uは、酸素原子、硫黄原子、窒素原子またはN

-Hであり、

nは、1~200の自然数である]

で示されるヌクレオチド配列の製造方法。

(4) 式(IX):



[式中、

Kは、水素原子、または別のヌクレオチドもしくはヌクレオチド配列のリン酸エチル残基のリ

ン原子であり、

Jは、ヒドロキシル基、または別のヌクレオチドもしくはヌクレオチド配列の5'位の酸素原子であり、

Bは、天然のまたは修飾された核塩基であり、

Tは、水素原子、低級アルキル基、アジド基、低級アルキルオキシ基、または所望により保護されたヒドロキシル基であり、N

Uは、酸素原子、硫黄原子、窒素原子またはN-Hであり、

Vは、開裂し得る保護基であり、

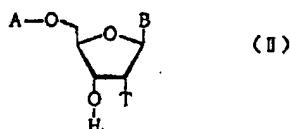
nは、1~200の自然数であり、

Dは、第2アミン残基である]

で示されるヌクレオシドホスホルアミダイト。

(5) 請求項2に記載の式(V)で示される化合物製造用の請求項5に記載の式(I)で示されるヌクレオシドホスホルアミダイト。

(6) 式(II):



[式中、

Aは、酸素原子保護基、ヌクレオチドまたはオ

リゴヌクレオチドであり、

Tは、水素原子、低級アルキル基、アジド基、低級アルキルオキシ基またはヒドロキシル基であり、

Xは、酸素原子または硫黄原子であり、

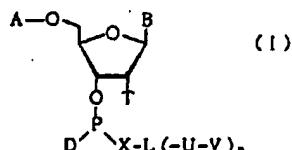
Lは、(n+1)価の架橋結合基であり、

Uは、酸素原子、硫黄原子、窒素原子またはN-Hであり、

nは、1~200の自然数である]

で示されるヌクレオチド配列。

(7) 式(III):



[式中、

Aは、酸素原子保護基、ヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドであり、

Bは、天然のまたは修飾された核塩基であり、

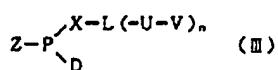
Xは、酸素原子または硫黄原子であり、

Lは、(n+1)価の架橋結合基であり、

Tは、天然のまたは修飾された核塩基であり、

Uは、水素原子、低級アルキル基、アジド基、低級アルキルオキシ基、または所望により保護されたヒドロキシル基である]

で示される化合物を、式(III):



[式中、

Zは、良好な離脱基であり、

Xは、酸素原子または硫黄原子であり、

Lは、少なくとも2価の架橋結合基であり、

Uは、酸素原子、硫黄原子、窒素原子またはN-Hであり、

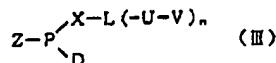
Vは、開裂し得る保護基であり、

nは、1~200の自然数であり、

Dは、第2アミン残基である]

で示されるホスファンと反応させることを特徴とする請求項5に記載の式(I)で示されるヌクレオシドホスホルアミダイトの製造方法。

(8) 式(IV):

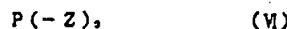


[式中、

Zは、良好な離脱基であり、  
 Xは、酸素原子または硫黄原子であり、  
 しは、少なくとも2価の架橋結合基であり、  
 Uは、酸素原子、硫黄原子、窒素原子またはN-Hであり、  
 Vは、開裂し得る保護基であり、  
 nは、1~200の自然数であり、  
 Dは、第2アミン残基である]

で示されるホスファン。

(9) 式(VI):



[式中、Zは良好な離脱基である]

で示される化合物と、式(VII):



[式中、Dは第2アミン残基である]

で示される第2アミンとを反応させ、得られた生成物を、式(VIII):

Jは、ヒドロキシル基、または別のスクレオチドもしくはスクレオチド配列の5'位の酸素原子であり、

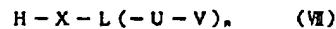
Bは、天然のまたは修飾された核塩基であり、Tは、水素原子、低級アルキル基、アジド基、低級アルキルオキシ基またはヒドロキシル基であり、

X、L、U、Wおよびnは、上記定義と同じである]

で示されるスクレオチド配列に対して本質的に相補的であるスクレオチド配列換出用の式(V)で示されるスクレオチド配列。

(11) 試料DNAに対して相補的である核酸として、請求項2に記載の式(V)で示されるスクレオチド配列を含むことを特徴とする試料に対して本質的に相補的である核酸と接触させることによる試料中の核酸の検出試薬。

(12) 二重鎖核酸の酵素合成におけるプライマー用の式(V):

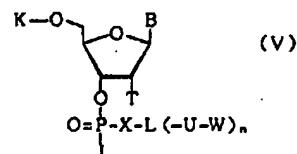


[式中、

Xは、酸素原子または硫黄原子であり、しは、(n+1)価の架橋結合基であり、Uは、酸素原子、硫黄原子、窒素原子またはN-Hであり、Vは、開裂し得る保護基であり、nは、1~200の自然数である]

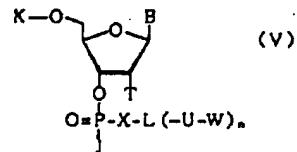
で示される化合物と反応させ、得られた生成物を単離することを特徴とする請求項8に記載の式(III)で示されるホスファンの製造方法。

(10) 式(V):



[式中、

Kは、水素原子、または別のスクレオチドもしくはスクレオチド配列のリン酸エステル残基のリノ酸原子であり、



[式中、

Kは、水素原子、または別のスクレオチドもしくはスクレオチド配列のリン酸エステル残基のリノ酸原子であり、

Jは、ヒドロキシル基、または別のスクレオチドもしくはスクレオチド配列の5'位の酸素原子であり、

Bは、天然のまたは修飾された核塩基であり、Tは、水素原子、低級アルキル基、アジド基、低級アルキルオキシ基またはヒドロキシル基であり、

X、L、U、Wおよびnは、上記定義と同じである]

で示されるスクレオチド配列。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、修飾された核酸を製造するための修飾されたホスホルアミダイト法およびこの方法に用いる新規な化合物に関するものである。

(従来の技術)

核酸は、世界中の生命にとって基本的に重要な要素であり、したがって、全ての生物中に存在している化合物である。遺伝情報は、その核酸中に蓄積される。核酸配列が個々の生物について特徴的であるので、該核酸は、異なる種の生物の区別および同定に関する規準でもある。したがって、核酸の合成および検出が多く試みられてきた。

核酸は、化学的または酵素的に合成することができる。自然に生じる $\beta$ 配型の核酸の化学合成によると、定義されたヌクレオチド配列を有する、該核酸を大量に製造することができる。近年、該化学合成は一層多く増加してきている。該化学合成は、特に、 $\beta$ 配型のオリゴヌクレオチドの合成について、行うことができる。別の方法は、使用するヌクレオチドビルディングブロックのタイプおよび配列中の隣接するヌクレオチドに結合さ

よって行われるべきであり、簡単な方法で、例えば低沸点を有する溶媒(例えば、ジクロロメタン)を用いてシリカゲルによって行うことはできない。

生成物が多く有機溶媒に不溶であるという欠点は、ホスホトリエスチル法によって回避される。

ホスホトリエスチル法では、反応性基を1つだけ有し、リン原子の隣りの2つのヒドロキシル基が異なる保護基で保護されているリノ酸誘導体が用いられる。第1のヌクレオシドとの反応の後、保護基のうちの1つを開裂し、次いで、形成されたヒドロキシル基を、第2のヌクレオシドとの反応のために活性化することができる。この方法の結果、活性化されたヌクレオシドホスフェートの収量を減少させる2つの追加の反応工程を、ヌクレオシドホスフェートにおいて行うことが必要である。

比較的高価な合成ビルディングブロックにおいて、より少ない反応工程で操作される特に優れている方法は、ホスホルアミダイト法として知られている[ゲイト、エム・ジェイ(Gait, M. J.)等、オ

せる反応工程によって区別することができる。

ホスホジエスチル法では、カップリング試薬、例えばトリアルキルアリルスルホン酸塩化物と共に、リノ酸エスチル残基以外の全ての反応性基が保護されているヌクレオシドリノ酸を、反応を起こすべきヒドロキシル基以外の全ての反応性基が保護されている別のヌクレオシドと反応させる。主として、オリゴヌクレオチド鎖を構築する総合工程中に、内部ヌクレオチド(リノ酸エスチル)結合の非エスチル化OH基において望ましくない副反応が生じ、複雑な反応混合物となるために、この方法における収率は低い。さらに、形成されたリノ酸ジエスチルは、いくつかのプロトン性溶媒にだけしか溶解することができず、該溶媒中でエスチル化を行わなければならないという大きい欠点を有している。ピリジン、ジメチルホルムアミドまたはジメチルスルホキシドのような溶媒は、例えば、沸点が高いというような周知の欠点を有している。ホスホジエスチル誘導体の極性特性の結果として、単離および精製は、イオン交換体に

リゴヌクレオチド・シンセシス: ア・プラクティカル・アプローチ(Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach), IRL Press(Press)オックスフォード(Oxford)。この方法では、リノ酸誘導体ではなくむしろリノ酸の誘導体、いわゆるホスホルアミダイト(phosphoramidite)が用いられる。以下の基:

- 第1のヌクレオシドと結合することができる反応性基、例えばハロゲン原子、
- 活性化の後に第2のヌクレオシドとの結合を行うことができる第2アミノ基、
- 保護基によって遮蔽されたヒドロキシル基を3価のリノ原子に結合させる。

ホスホルアミダイト法の第1工程において、リノ酸誘導体と、第1のヌクレオシドとを反応させる; この工程において、該ヌクレオシドは、反応性基を置換する。第2工程において、第2アミノ基を第2のヌクレオシドによって選択的に置き換える。該第2工程では、活性化試薬として、通常、テトラゾールが用いられる。次の工程におい

て、このヌクレオチド配列を、例えばヨウ素を用いて酸化し、保護基を開裂除去する。1つの変法としては、ホスホルアミダイト法が固相法として開示されている。この変法では、成長するヌクレオチド配列を固相に結合させる。過剰の合成試薬およびビルディングブロックの分離ならびにオリゴヌクレオチド配列の精製は、この方法によって非常に簡素化される。市販の入手可能な自動核酸合成器は、この方法に従って作動する。これらの構造は、例えば、ホスホルアミダイト法の特定の工程に適合している。

特に、生物学的試料中のDNAの特異的な検出に、既知のヌクレオチド配列を有する核酸を適用している。

このような検出法では、ある核酸と別の核酸の一重鎖が互いに相補的であるヌクレオチド配列を有しており、両者がリボースのC-1で同一の配置(αまたはβ)を有している場合には、ある核酸の一重鎖が別の一重鎖核酸と反応して、二重鎖を形成することができるという性質を利用している。

核酸を用いて核酸の量を測定する方法は、あまり感受性が強くない。

したがって、EP-A 0173251において、完全な核酸の塩基が化学反応によって修飾されることが示唆されていた。しかし、このために、いくつかの核酸の反応工程が必要であり、修飾の割合は、核酸が遊離アミノ基を含む塩基を含んでいるか否かに依存しており、この修飾は、相補的核酸とハイブリダイズする能力を損なわない。

ジェゲル(Jäger)等[バイオケミストリー(Biochemistry)、第27巻、第7231頁、1988年]には、リン原子に修飾を有するジヌクレオチドの製造が記載されている。該修飾は、リンカーを介して結合している第1アミノ基からなっており、通常のホスホルアミダイト法と類似の方法に導入される。

しかし、この方法は、ホスホルアミダイトを使用する通常の自動合成器では行うことができない。他の欠点は、遊離アミノ基が、これに使用する求電子試薬と反応するので、もはや追加のヌクレオチドと結合し得ないということである。

自然に生じる核酸は塩基類および糖類の結合に関してβ配置を有しているので、特に、β核酸は、相補的核酸として考慮され得る。この二重鎖形成方法は、ハイブリダイゼーションと称されている。

修飾された一重鎖の相補的核酸を、一重鎖核酸とのハイブリダイゼーションに用いると、二重鎖の形成を検出することができる。その後、例えば放射性標識であってもよい修飾によって、ハイブリダイズされた核酸の量を測定する。

修飾された核酸の合成に関して、既に入手可能である天然の核酸を化学的もしくは酵素的に修飾することができるか、または既に修飾されたヌクレオチドビルディングブロックの助けによってヌクレオチド配列を合成することができる。

しかし、例えば、WO 86/07363において5'-末端について示唆されているように、既に完全に合成された核酸の末端を修飾することによって、一重鎖あたり修飾されたヌクレオチドを1つだけ含む核酸を製造することができる。したがって、プローブとしてこのタイプの修飾された

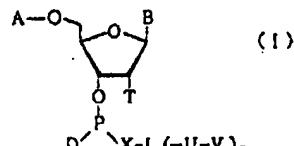
したがって、入手可能な従来技術の方法は、それぞれ、かなりの欠点を有している。

(発明が解決しようとする課題)

本発明は、既知の方法の欠点を回避すること、さらに詳細には、高い収率を有し、いくつかの反応工程において簡単な出発物質で行うことができるリン酸エステル残基の位置で修飾されたβ配置の核酸の固相上における合成方法を利用可能にすることを目的とするものである。

(課題を解決するための手段)

本発明は、ヌクレオシドホスホルアミダイトを、遊離ヒドロキシル基を有する別のヌクレオチドと反応させ、ついでリン酸エステルに形成されるヌクレオチド配列を酸化することを特徴としており、該ヌクレオシドホスホルアミダイトとして式(I):



[式中、

Aは、酸素原子保護基、スクレオチドまたはオリゴスクレオチドであり、

Bは、天然のまたは修飾された核塩基であり、  
Xは、酸素原子または硫黄原子であり、

しは、(n+1)価の架橋結合基であり、

Tは、水素原子、低級アルキル基、N<sub>3</sub>、低級アルコキシ、または所望により保護されたヒドロキシル基であり、

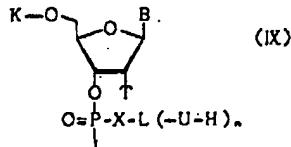
Uは、酸素原子、硫黄原子、窒素原子またはN-Hであり、

Vは、開裂し得る保護基であり、

nは、1~200の自然数であり、

Dは、第2アミン残基である】

で示される化合物を使用する、式(IX)：



【式中、

Kは、水素原子、または別のスクレオチドもし

第67巻、第673頁~第684頁によって、本質的には知られている。本発明の方法は、特に、式(1)で示される別のスクレオシドホスホルアミグイトを出発物質として用いる従来技術の方法とは異なる。

式(1)における残基Aは、好ましくは、酸素原子保護基である。スクレオチド合成において5'ーヒドロキシル基の保護に適している保護基は、公知である。酸性条件下で開裂することができるトリフェニルメチル基またはジメトキシトリフェニルメチル基のような保護基が非常によく用いられる。

残基Aがスクレオチドまたはオリゴスクレオチドである場合、それは天然のまたは修飾されたスクレオチドまたはオリゴスクレオチドのいずれであってもよい。オリゴスクレオチドを用いる合成はより困難であるので、オリゴスクレオチドよりもスクレオチドのほうが好ましい。残基Aのスクレオチドまたはオリゴスクレオチドは、本発明によって製造される残基であってもよい。残基Aの

くはスクレオチド配列のリン酸エチル残基のリソ原子であり、

Jは、ヒドロキシル基、または別のスクレオチドもしくはスクレオチド配列の5'位の酸素原子であり、

Bは、天然のまたは修飾された核塩基であり、

Tは、水素原子、低級アルキル基、アジド基、低級アルキルオキシ基またはヒドロキシル基であり、

Xは、酸素原子または硫黄原子であり、

しは、(n+1)価の架橋結合基であり、

Uは、酸素原子、硫黄原子、窒素原子またはN-Hであり、

nは、1~200の自然数である】

で示されるスクレオチド配列の製造方法を提供するものである。

低級アルキル基および低級アルコキシ基は、炭素原子を1~6個、好ましくは1~4個有する。

いわゆるホスホルアミグイト法による核酸の製造方法は、例えば、ビオシミィ(Biochimie) 1985、

スクレオチドまたはオリゴスクレオチドの反応性基を適当な保護基によって保護するのが好ましい。特に、残基Aのスクレオチドまたはオリゴスクレオチドの末端の5'ーヒドロキシル基を酸素原子保護基によって保護する。この酸素原子保護基は、特に、残基Aについて上述した定義を有する。

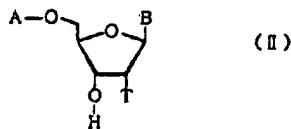
残基Bの天然の核塩基は、好ましくは、アデニン、チミン、シトシン、ウラシルまたはグアニンである。修飾された塩基は、例えば、それらの構造を環または置換基において変化させた塩基であつてもよい。例えば、7-デアザグアニンまたは5-アミノアルキルウラシルまたは8-アミノヘキシルーアミノアデニンが挙げられる。これらの塩基は好ましく、核塩基において相補的核酸のとウツン-クリック塩基対に全く影響を与えないか、または極端にだけに影響を与えるだけである。

残基Tは、リボまたはアラビノ配置を有し得る。好ましくは、リボ配置である。塩基性、酸性または求核条件下で開裂することができる基、好ましくは、t-ブチルジメチルシリル基またはトリイ

ソブロビルシリル基は、ヒドロキシル基に関する保護基として使用することができる。

保護基Vは、選択的に開裂し得る保護基であるのが好ましい。完全なスクレオチド配列を固体から開裂する条件下で同時に開裂し得る保護基が好ましい。したがって、例えば残基Aにおいて記載したような酸性条件下で開裂し得る保護基は、好ましくない。故に、アルカリまたはアンモニア条件下で開裂し得る保護基が特に好ましく、フルオレニルメトキシカルボニル基またはトリフルオロアセチル基が特に好都合であることが確認された。

式(I)で示される化合物は、式(II)：



〔式中、

Aは、酸素原子保護基、スクレオチドまたはオリゴスクレオチドであり、

の条件が当業者によって選択され得る。しかし、この方法において、試薬を用いる場合は、保護基Vを開裂し得る試薬を用いないように注意しなければならない。個々の保護基に関するこれらの反応条件は、当業者に知られている。

式(III)で示されるホスファンは、簡単な方法で、市販の入手可能な出発物質から合成され得る。好ましい製造方法において、第2アミンがより安価な粗製物質であるが故に、第2アミンとの反応が最初に計画される。この反応工程において、必要であれば、非特異的な反応による収率の損耗は容認し得る。式(III)で示されるホスファンは、好ましくは、式(V)：



〔式中、Zは良好な離脱基である〕

で示される化合物と、式(VI)：

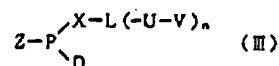


〔式中、Dは第2アミン残基である〕

で示される第2アミンとを反応させ、得られた生成物を、式(VII)：

Bは、天然のまたは修飾された接基であり、Tは、水素原子、(所望により保護された)ヒドロキシル基、低級アルキル基、N<sub>2</sub>または低級アルキルオキシ基である]

で示される化合物を、式(VIII)：



〔式中、

Zは、良好な離脱基であり、

Xは、酸素原子または硫黄原子であり、

Lは、少なくとも2価の架橋結合基であり、

Uは、酸素原子、硫黄原子、窒素原子またはN-Hであり、

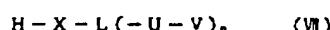
Vは、開裂し得る保護基であり、

nは、1～200の自然数であり、

Dは、第2アミン残基である〕

で示されるホスファンと反応させることによって製造することができる。

該反応条件としては、従来技術のスクレオジドホスホルアミダイトについて既述した条件に類似



〔式中、

Xは、酸素原子または硫黄原子であり、

Lは、(n+1)価の架橋結合基であり、

Uは、酸素原子、硫黄原子、窒素原子またはN-Hであり、

Vは、開裂し得る保護基であり、

nは、1～200の自然数である〕

で示される化合物と反応させ、形成された生成物を単離することによって製造される。残基Zは、好ましくはハロゲン原子であり、特に好ましくは塩素原子である。

式(VII)で示される化合物は、特に、式：



〔式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、同一または異なっており、1～10個の炭素原子を有する第1、第2または第3アルキル基であるか、または所望により、一緒に、ヘテロ原子として1または2つの窒素原子、酸素原子および/または硫黄原子を含有し得る5～7個の炭素原子を有するアルキル分枝鎖状

シクロアルキル基を示すか、または  $NR_1R_2$  はイミダゾリル基、トリアゾリル基、テトラゾリル基、3-ニトロ-1,2,4-トリアゾリル基、チアゾリル基、ピロリル基、ベンゾトリアゾリル基もしくはベンゾヒドロキシトリアゾリル基である】で示される、当業者に知られている第2アミンである。ジイソプロピルアミンおよびモルホリンが特に好ましいアミンであることが確認されている。

直鎖状または分枝鎖状の、飽和または不飽和の、炭素原子1~10個、好ましくは2~6個を有する炭化水素は、架橋結合基として有用である。炭化水素鎖は、ヘテロ原子、例えば酸素原子または硫黄原子によって中断されていてもよい。該架橋結合基は、脂肪族環系または芳香族環系を含んでいてもよい。さらに、該架橋結合基は、ヘテロ原子を含んでいてもよい。しかし、本発明方法においてこの架橋結合基を含有する化合物と行われるべき反応に関して、これらの架橋結合基としては、置換基として遊離非置換アミノ基もしくは第1アミノ基またはヒドロキシル基を有するものを除外

在し得る2'-ヒドロキシル基は、1-ブチルジメチルシリル基によって保護されているのが好ましい。遊離ヒドロキシル基は、糖残基の5'-ヒドロキシル基であるのが好ましい。

スクレオシドは、モノスクレオシド、オリゴスクレオチドまたはポリスクレオチドであつてよい。しかし、2~200、好ましくは20~80のスクレオチドビルディングブロックを有するモノスクレオシド、オリゴスクレオチドまたはポリスクレオチドが好ましい。スクレオチドビルディングブロックは天然のまたは修飾されたスクレオチドであつてよい。

該スクレオシドは、本発明の方法で修飾されたスクレオシドであつてもよい。

その後、固相に結合したスクレオチド配列を酸化する。ヨウ素が好ましい酸化剤であることが確認されている。

次に、キャッピング工程(capping step)を行うのが好ましい。これは公知の方法に従つて行われる。

しなければならない。該架橋結合基は、n個の共有結合を介して、n個の基Uと結合する。nの数は、1から200までが好ましい。

式(III)で示される化合物は、核酸のホスホルアミダイト合成用のスクレオシドホスホルアミダイトの合成に用いることができ、かつ保護された形の反応性基を有する、従来技術のホスファンに比べて優れており；これは、検出可能な基に関する結合部位として作用することができる。

スクレオチド配列の製造に関する本発明の方法は、特に、下記工程を含む：

式(I)で示されるスクレオシドホスホルアミダイトと、遊離ヒドロキシル基を有するスクレオチドとのカップリング反応。遊離ヒドロキシル基を有するスクレオシドは、固体担体に共有結合されるのが好ましい。アミノ基、カルボニル基または別のヒドロキシル基のようなスクレオシドの別の反応性基は、カップリング反応の条件下で安定である保護基によって保護されているのが好ましい。糖残基に存

保護基Aまたは残基Aのスクレオチドまたはオリゴスクレオチドの末端5'-ヒドロキシル基の酸素原子保護基の選択的開裂。好ましい場合において、残基Aの酸素原子保護基が酸性条件下で開裂し得るジメトキシトリフェニルメチル基のような保護基である場合、それは、例えば、ジクロロ酢酸によって開裂され得る。

ここで、所望により、これら第1の工程を繰り返すことができる。これに関して、モノスクレオシドホスホルアミダイトとして、慣用のモノスクレオシドホスホルアミダイトまたは式(I)で示されるモノスクレオシドホスホルアミダイトを用いることができる。

スクレオチド配列が所望の長さに達するとすぐに、保護基Vを開裂する。アミノ保護基の場合、トリフルオロアセチルまたはフルオレニルメトキシカルボニル基(Fmoc)が特に優れていることが確認されている。

その後、既知の方法で固体担体からスクレ

オチド配列を開裂する。この条件は、共有結合のタイプに応じて選択され、本発明の修飾によっては影響されない。

しかし、これらの条件としては、保護基Vの開裂および担体からのスクレオチド配列の開裂が同時に行われる条件が特に好ましい。これは、例えば、3'-O-スクシニルを介してCPG[制御されたポアガラス(controlled pore glass)]に結合した担体および残基VとしてのFmoc保護基の利用によって行うことができ、これには、開裂試薬として、アルカリ、好ましくは過アンモニア水溶液またはアミン溶液が用いられる。

通常、次に、精製工程、例えばHPLCクロマトグラフィーまたは/および透析による精製が行われる。一般的にオリゴスクレオチド合成に用いられるのと同一の条件が適用される。

これら全ての工程は、別のスクレオシドホスホルアミダイトが用いられ、リン酸エステル残基の

を有する。

例えば、スクレオチド配列は、簡単な方法で、検出可能な基または検出可能な基に変化し得る基を有する、本発明方法で製造した式(IX)で示されるスクレオチド配列から製造することができる。スクレオチド配列がいくつかの修飾されたスクレオチドビルディングブロックを有する場合、このような基をいくつか含有するスクレオチド配列を製造することができる。結果として、核酸の測定がより高感度になることが確認されており、このために、この方法は好ましい。

さらに、本発明は、上記工程の後に、形成された式(IX)で示されるスクレオチド配列と式(N)：



【式中、

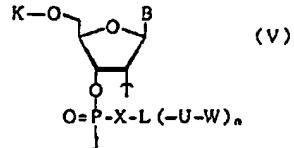
Yは、反応性基であり、

Wは、検出可能な基または検出可能な基に変化し得る基である】

で示される化合物とを反応させることからなる、式(V)：

酸素原子保護基を開裂するための試薬の代わりに保護基Vの開裂用の既存の試薬が用いられるという事は別にして、この方法の慣用の反応経路の変化を必要としないという共通点を有する。特に、工程の数は、慣用のホスホルアミダイト法と同じであるかまたはそれよりも少ない。すなわち、本発明の方法は、装置を変えずに、ホスホルアミダイト合成用の入手可能な核酸合成器で行うことができる。

この方法で製造される式(IX)で示されるスクレオチド配列は、好ましくは2~200、特に好ましくは20~60のスクレオチドビルディングブロックを有する。スクレオチドビルディングブロックの10~80%、特に好ましくは20~50%は、リン原子の位置で修飾された式(I)で示されるスクレオシドーリン酸から形成されたスクレオチドビルディングブロックである。これらの修飾されたスクレオチドビルディングブロックは、配列中で互いに2~5スクレオチド間隔であるのが好ましい。式(IX)で示される化合物は多くの用途



【式中、

Kは、水素原子、または別のスクレオチドもしくはスクレオチド配列のリン酸エステル残基のリン原子であり、

Jは、ヒドロキシル基、または別のスクレオチドもしくはスクレオチド配列の5'位の酸素原子であり、

Bは、天然のまたは修飾された核塩基であり、

Tは、水素原子、低級アルキル基、アジド基、低級アルキルオキシ基またはヒドロキシル基であり、

Wは、検出可能な基または検出可能な基に変化し得る基であり、

X、J、UおよびWは前記定義と同じである】

で示されるスクレオチド配列の製造方法を提供するものである。

容易に置換することができる求核基、または求電子基は、例えば、反応性基Yとして使用することができます。式(IV)で示される化合物は、例えば、カルボン酸ハロゲン化物である。

求電子基は、例えば、活性化エステルまたは無水物中の基である。これらがカルボキシル基である場合、好ましいエステルは、例えば、ハブテンのN-ヒドロキシスクシンイミドエステルである。

残基KまたはJの定義に含まれる別のヌクレオチドは、天然のまたは修飾されたヌクレオチドであってよい。残基KまたはJの定義に含まれるヌクレオチド配列は、天然のおよび修飾されたヌクレオチドビルディングブロックを含有し得る。式(V)で示されるヌクレオチド配列は、好ましくは2~200、特に好ましくは20~80のヌクレオチドビルディングブロックを有する。ヌクレオチドビルディングブロックの10~80%、特に好ましくは20~50%は、式(I)で示されるヌクレオシド-リボン酸から形成されたヌクレオチドビルディングブロックである。

によってプライマーとして受け入れられる。

修飾は、例えば糖残基もしくは塩基の別の修飾、または3'-もしくは5'-末端標識に附加的に生じる。

該方法は、必要なビルディングブロックの集中合成(convergent synthesis)を含む。このような方法は、特に高価なヌクレオチドビルディングブロックの収率を高く維持することができる、特に優れている。

容易に入手でき、自然に生じるヌクレオシドをヌクレオシドホスホルアミダイトの合成に用いることができる。

リン酸エステル基の位置で修飾されたヌクレオチド配列を合成するために、同一または減少した反応工程の数と共に、ヌクレオチド配列の合成のための固相ホスホルアミダイト法の周知の長所を利用することができた。

本発明の方法を用いて、配列における全く特定の部位で非常に特定数の修飾を導入することができる。

残基Wは、低分子構造および高分子構造であつてよい。好ましい低分子のレポーター分子は色素およびハブテンであり；好ましい高分子群は、例えば、酵素、または抗原もしくは抗体のような免疫学的に活性な物質である。特に好ましくは、ハブテンである。例えば、ジゴキシゲニンのような体液中で通常の条件下では生じないものが特に好ましい。ハブテンおよび特に好ましいジゴキシゲニンは、これらを有するヌクレオチド配列の分子量が修飾によってあまり変化せず、例えばゲルクロマトグラフィーにおいて、長さの標準として用いることができる、免疫学的に活性な物質として特に優れていることが確認されている。

さらに、ヌクレオチド配列の構築に関する本発明方法は、従来技術と比較して以下の優れた点を有していることがわかった：

修飾がリソマチック位置で生じるので、相補的ヌクレオチド配列と共に形成されたヌクレオチド配列の塩基対は損なわれない。

形成されたヌクレオチド配列はポリメラーゼ

一般に、形成された修飾されたヌクレオチド配列を用いることができる。例えば、異なる検出可能な基を選択することができる。

検出可能な基がヌクレオシドホスホルアミダイトに最初から存在しないので、酵素標識または別の感受性レポーター基を用いる場合に予想されるヌクレオチドの化学合成の間の複雑化が回避される。

レポーター分子による立体障害は、オリゴヌクレオチド合成の収率および効率を減少することがある。この欠点は、本発明の方法で回避される。

試料中の核酸に本質的に相補的である核酸と試料との接触、他方に相補的である核酸のハイブリダイゼーションを生起させる条件下での該混合物の処理および検出可能な基の検出による試料中の核酸の検出方法において、式(V)で示されるヌクレオチド配列は、試料DNAに相補的なヌクレオチド配列として好都合に用いることができる。検出可能な基の検出は、既知の方法によって行うこ

とができる。検出可能な基が免疫学的に活性な物質である場合、該基は、標識化された免疫学的パートナーと反応し得る。その後、標識を測定する。本発明の核酸利用の場合、基Wとして、ハプテン、特にジゴキシゲニンが好ましい。

これらは、一重鎖核酸から二重鎖核酸への酵素的合成におけるプライマーとして同様に好適である。形成された二重鎖核酸は、2つの鎖のうちいずれか一方にスクレオチド配列を含有している。

#### (実施例)

以下の実施例によって、本発明を説明する。

##### 実施例1

###### 2-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)アミノエタノール

容量1ℓの丸底フラスコ中、搅拌しながら、ジオキサン300mℓに9-フルオレニルメトキシカルボニル-N-ヒドロキシスルホニミドエステル(Proc-O-Su)68.0g(約200ミリモル)を溶解した。該透明溶液に、水200mℓに溶解したNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>4.0gおよびエタノールアミン14.

内で滴下し、温度を約-80~-85℃に維持した。添加終了後、濃いバルブ状反応混合液を室温にし、無水エーテル約600mℓで希釈して、さらに搅拌し易くした。室温でさらに3時間搅拌した後、形成した沈殿物をガラスフィルターで吸引通過し、エーテルで数回洗浄した。常圧でエーテルを排水した後、水流ポンプ(water-jet vacuum)で未反応PCl<sub>3</sub>、ジイソプロピルアミンおよびビリジンを除去し、次いで、残存した油状物をオイルポンプバキューム(oil-pump vacuum)(K, 4.6℃/0.35Torr)で分別蒸留した。理論収量の36%に相当するホスファン73.4gを得た。

31P-NMR(ppm)(CHCl<sub>3</sub>): 167.5。

##### 実施例3

###### 2-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)アミノエチル-N,N-ジイソプロピルアミノ-ホスホクロリダイト

容量100mℓの丸底フラスコ中、無水テトラヒドロフラン30mℓにジクロロ-N,N-ジイソプロピルアミノ-ホスファン0.9g(6ミリモル)

4mℓ(23.8ミリモル)を連続して添加した。すぐに形成したバルブ状(pulpy)反応混合液を、室温で一晩搅拌し、翌日、吸引通過した。未反応のProc-O-Su、N-ヒドロキシスルホニミドおよび目的生成物を含有する通過残渣を酢酸エステルから再結晶した。減圧乾燥した後、純な生成物47.4g(理論収量の76%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR(ppm)(DMSO): 3.4(m,CH<sub>2</sub>O,2H); 3.6(t,CH<sub>2</sub>,1H); 4.2-4.5(m,CH<sub>2</sub>OOC+H[CH<sub>2</sub>],2H); 5.2(s,[b],NH,1H); 7.2-7.9(n,芳香族,8H)。

##### 実施例2

###### ジクロロ-N,N-ジイソプロピルアミノ-ホスファン

容量500mℓの滴下漏斗、KPGスター、温度計およびアセトン/ドライアイス浴を装備した容量2ℓの3つ口丸底フラスコ中、搅拌しながら、無水エーテル300mℓ、無水ビリジン81mℓおよびPCl<sub>3</sub>87.5mℓ(1モル)を-70℃に予め冷却した。それに無水エーテル250mℓ中ジイソプロピルアミン142mℓ(1モル)を、2時間以

を溶解し、これに無水ビリジン0.4mℓを添加した。磁気的に搅拌しながら、この混合液に、無水テトラヒドロフラン20mℓに2-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)アミノエタノール(5ミリモル)1.4gを溶解した溶液を、約5時間、ゆっくりと滴下した。テトラヒドロフランを分離および排水したビリジン・塩酸塩を吸引通過した後、残存した油状物(2.2g-理論収量の98%)を、スクレオシドホスホルアミグイトの製造に直接用いた(実施例4参照)。

##### 実施例4

###### 5'-O-ジメトキシトリチル-2'-デオキシチミジン-3'-O-[2-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)アミノエチル]-N,N-ジイソプロピルアミノ-ホスファン

a) 容量100mℓの丸底フラスコ中、ジクロロメタン(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>で蒸留した)50mℓおよびN-エチル-N,N-ジイソプロピルアミン2.5mℓに5'-O-ジメトキシトリチル-2'-デオキシチミジン2.6g(4.6ミリモル)を溶解した。使い

捨て注射器を用いて、これに2-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)アミノエチル-N,N-ジイソプロピルアミノ-ホスホクロリダイト2g(約5ミリモル)を加えた。室温で48時間攪拌し、減圧下で蒸発させ、粘稠性の残留物を得た。

粗生成物をシリカゲル60[カラム30×2cm、移動溶媒:石油エーテル50~70℃/酢酸エチル/ジクロロメタン/ピリジン(4:8:8:2)]によるクロマトグラフィーによって精製した。生成物を含有する画分を集め、溶媒を完全に減圧除去した。

理論収量の20%に相当する白色の泡状残留物0.9gを得た。

b) 別法として、攪拌しながら、無水ジオキサン100mlに5'-O-ジメトキシトリル-2'-デオキシチミジン5.45g(10ミリモル)を溶解した。この溶液に、ハンモト(S. Hamamoto)、タカク(H. Takaku)[ケミストリー・レターズ(Chemistry Lett.), 1986, 1401-1404]に従って調製したピース-(ジイソプロピルアミノ)-クロロホスファンを目的生成物に転換した。これについて

去した後、濾液を濃縮した。粗生成物を、シリカゲル60H[ $l=2.4\text{cm}$ ,  $d=4\text{cm}$ ; 移動溶媒: 塩化メチレン/酢酸エチル(5:1)]によるクロマトグラフィーによって精製した。溶媒の除去後、無色の泡状物を再度得た。これを塩化メチレン10ml中に取り、氷冷したn-ヘキサン400mlによって沈殿させた。理論収量の20%に相当する無色粉末の目的生成物1.8gを得た。

2つのジアステロマーは、TLCおよび $^3\text{P}$ -NMRによって識別することができる。

RF値( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EA}$ =1:1): 0.04, 0.15。

$^3\text{P}$ -NMR (ppm) ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ): 146.7, 145.8。

#### 実施例5

##### $d(\text{Tp}_{\text{AET}}\text{Tp}\text{Tp}\text{Tp}\text{Tp}\text{Tp}\text{Tp}_{\text{AET}})$ の合成

オリゴヌクレオチドの合成は、バイオサーチカンパニー(BioSearch Company)から入手した完全自動DNAシンセサイザ-8600において標準的なプロトコールに従って1マイクロモルの大きさで行った。合成装置は、1マイクロモルのチミジン担体で被覆された反応カラムを装替してお

り、2.7g(10ミリモル)、およびトリエチルアミン2.1ml(15ミリモル)をジオキサン100mlに溶解した溶液を、30分以内で滴下した。反応の後、移動溶媒として塩化メチレン/酢酸エチル(1:1)を用いる薄層クロマトグラフィーにかけた。2時間後、保護アルゴンガス(protective gas, argon)の存在下、塩化トリエチルアンモニウムの沈殿物を滤去し、濾液を濃縮した(無色の泡状物)。さらに単離せずに、形成された5'-O-ジメトキシトリル-2'-デオキシチミジン-3'-O-ピース-(N,N-ジイソプロピルアミノ)ホスファンを目的生成物に転換した。これについては、無色の泡状物を無水アセトニトリル100ml中に取り、2-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)アミノエタノール(実施例1)3gおよびテトラゾール(昇華した)3.5mg(5ミリモル)を添加した。室温で一晩攪拌し、酢酸エチル100mlの添加によって、反応を停止した。塩化ナトリウム飽和水溶液で3回抽出した後、合わせた有機相を硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムを過

り、第1反応工程において、ジクロロメタン中2%ジクロロ酢酸溶液で処理して、5'-OH保護基(ジメトキシトリル)を開裂させた。該カラムをアセトニトリルで洗浄した後、本発明に従ってP原子の位置で修飾された実施例4の5'-O-ジメトキシトリフェニルメチル-2'-デオキシチミジン-3'-O-[2-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)アミノエチル]-N,N-ジイソプロピルアミノ-ホスファンと、出発ヌクレオシドの遊離5'-OH基とをカップリングし、同時に、アセトニトリル中でテトラゾールによって活性化した。3価の形で存在したままであるP原子を、洗浄を繰り返した後、THF/ルチジン/ $\text{H}_2\text{O}$ にヨウ素を溶解した溶液で酸化することによって、天然の5価のリン酸エステルに転換した。次の無水酢酸/ジメチルアミノピリジンによるキャッピング工程によって、アセチル化による非結合の5'-OH-ヌクレオシドを保護した。この方法によって、正しくない配列の形成が抑制された。洗浄後、5'-O-ジメトキシトリル

保護基を繰り返し開裂することによって出発から合成サイクルを再開した。この方法で、最終段階におけるアミノエチル化チミジン-ホスホルアミダイト( $T_{PAB}$ )とさらにカップリングを行う前に、非修飾ホスホルアミグイト分子を有する6チミジンビルディングブロックを反応配列に導入した。合成終了後、担体に結合したオリゴヌクレオチドを、濃アンモニア水溶液による処理によって解放し、これによって、同時にアミノエチル化リン酸エステルのF<sub>ac</sub>保護基が除去された。結果は、86 ODU/A<sub>260</sub>であった。この粗製混合物を以下の条件下でHPLCにかけた。

カラム：モノ(Mono)Q HR 10/10 [ファルマシア(Pharmacia)]。

溶離液A：水。

溶離液B：0.5 N LiCl。

勾配液：60分間でAから50%Bまで。

溶出液をH<sub>2</sub>Oに対して一晩透析した[スペクトレーパー(Spektrapor)、MWCO 1000]。

収量：55 ODU。

水中に取り、蒸留水に対して一晩透析した[スペクトレーパー(Spektrapor)、MWCO 1000]。

収量：11 ODU/A<sub>260</sub>。

#### 実施例7

##### DNA試験における検出限界の比較

HIVに対して特異的な配列を有する3つの同一のオリゴヌクレオチド(3' overhang)のハイブリダイゼーション特性を、クローンしたHIV-DNA Aフラグメント(HIV-WT, 13-Aイソレートのgag領域由来の954 bp PvuII/BglIIフラグメント)に対して試験した。オリゴヌクレオチドの下記部位を、ジゴキシゲニンで標識化した：

1. それぞれ、5'-末端ウラシルおよび中央部に位置するウラシル(すなわち、2つのディグ標識(dig labels)、ウラシルのC-5での塩基標識)、
2. それぞれ、5'-末端、3'-末端および中央部に位置するウラシル(すなわち、3倍のディグ標識、ウラシルのC-5での塩基標識)、

#### 実施例8

##### ジゴキシゲニンによる実施例5からのオリゴヌクレオチドの標識化

0.1 mMウ酸ナトリウム緩衝液1 mL(pH 8.5)に実施例5からのオリゴマー-55 ODU/A<sub>260</sub>を溶解し、ジメチルホルムアミド1 mLにジゴキシゲニン-O-スクシニルーアミドカプロン酸-N-ヒドロキシスクシシンイミドエステル1.0 mgを溶解した溶液と混合した。この混合液を室温で18時間攪拌し、減圧下で蒸発乾固し、H<sub>2</sub>Oに溶解し、生成物を含有する混合液を以下のHPLCで分離した：

カラム：シャンソン・ハイパーシル(Shandon II hypersil) ODS、25 cm × 0.4 cm。

溶離液A：0.1 mM酢酸トリエチルアンモニウム溶液。

溶離液B：0.1 mM酢酸トリエチルアンモニウム溶液/イソプロパノール。

勾配液：30分間かけてAから50%Bまで。

生成物回分を、減圧下で蒸発によって濃縮し、

3. それぞれ、5'-末端リン酸エステル残基および中央で位置するリン酸エステル残基(本発明に従って標識する、2つのディグ標識/分子)。

##### a) ディグ標識を有するオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション調製法

試料DNAを1 μLの容量ずつ一連の希釈系にフィルター上で直接スポットするか、または、アガロースゲル中で分離した後、フィルター上に、2.0 × SSC緩衝液を用いるサザーンプロットによって移した。3分間、UV照射によって固定化を行った。

フィルターを以下の条件下で予めハイブリダイズした：5 × SSC中、40°Cで1時間、0.5%保護試薬。以下の条件下で、ディグ標識化したオリゴヌクレオチドとの次のハイブリダイゼーションを行った：5 × SSC中、4°Cで一晩、0.5%保護試薬、ハイブリダイゼーション溶液1 mLあたりオリゴヌクレオチド200 ng。

次いで、フィルターを、2 × SSC、0.1%

SDS中、40℃で10分間、4回洗浄した。  
オリゴキシゲニンに対するPOD-標識化抗体を用いて、非放射性標識化および検出装置[ベーリンガー・マンハイム・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング(Boehringer Mannheim GmbH)]に類似の検出を行った。

## b)結果

スポット/プロットされた試料DNAの検出限界は、

(1)2倍塩基標識化オリゴスクレオチドで10 ng、

(2)3倍塩基標識化オリゴスクレオチドで10 ng、

(3)リン酸エステルによって2倍標識化されたオリゴスクレオチドで1~10 ng  
であった。

特許出願人 ベーリンガー・マンハイム・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング

代理人 弁理士 齋山 葵 ほか1名

## 第1頁の続き

②発明者	クラウス・ミューレゲル	ドイツ連邦共和国8121ボリンク、レーメルストラーゼ7番
②発明者	ヘルベルト・フォン・デル・エルツ	ドイツ連邦共和国8120バイルハイム、イン・デル・アウ21番
②発明者	ハンス-ゲオルグ・バツ	ドイツ連邦共和国8132トウツインク、トラウビングルーストラーゼ63番